第2卷第4期增刊　　　　动物学研究　　　　Vol.2, No.4
1981年11月　　　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　　　Nov.,1981

浙江产蝮蛇(*Agkistrodon halys* Pallas)蛇毒血纤蛋白溶酶酶学性质的研究

涂光俸　于　力　许金菊　冉永禄
（中国科学院昆明动物研究所）

摘　要

浙江产蝮蛇毒血纤蛋白溶酶是一种"金属蛋白酶"，Ca^{++} 和 Mg^{++} 明显地激活它水解酪蛋白的活力，但 Mg^{++}, Co^{++} 和 Cu^{++} 强烈抑制酶活力。金属螯合剂—EDTA在 5×10^{-4} M的浓度就能完全抑制酶活力，这种抑制能为 Ca^{++} 所解除。

该酶水解酪蛋白的最适 pH 大约为8.5，最适温度在40°C左右。该酶对热很不稳定，在37°C保温就丧失活力。Ca^{++} 能明显增强酶的对热稳定性，但EDTA降低这种对热稳定性。四种巯基化合物中，半胱氨酸降低酶对热稳定性的效果最为明显，其次为巯基乙醇和巯基乙酸，但谷胱甘肽（GSH）却不降低酶的对热稳定性。巯基试剂对氯汞苯甲酸（PCMB）和碘代乙酸对酶的对热稳定性也无影响。

与眼镜蛇科和海蛇科蛇毒不同，蝮亚科蛇毒富含精氨酸酯酶和非专一性蛋白水解酶。前者也是一种蛋白水解酶，只是作用专一性较强，而且对热稳定。

蛇毒精氨酸酯酶多与蛇毒的促凝作用有关，蛇毒蛋白水解酶则与蛇毒的抗凝和纤溶作用有关，人们对前者的研究远较后者深入。Oshima 等[1,2]报道日本蝮蛇(*Agkistrodon halys blomhoffi*) 蛇毒含有三个蛋白水解酶，即蛋白酶 a、b、c。其中蛋白酶 b 与蛇毒的出血活性有关，蛋白酶 c 与蛇毒的肿胀效应有关，蛋白酶 a 的药理作用尚不明了。

我们从浙江产蝮蛇毒中分离纯化了一种血纤蛋白溶酶，它不仅能水解酪蛋白，还能水解纤维蛋白，纤维蛋白原，第Ⅴ因子和第Ⅷ因子[3,4]。本文报道了该酶的某些酶学性质以及Ca^{++}、EDTA、巯基试剂和巯基化合物等物质对酶热失活速率的影响。

材料和方法

血纤蛋白溶酶：按照前文方法[3]制备。

试剂：巯基乙醇，上海试剂四厂产品；巯基乙酸，上海第二军医大学产品；谷胱

甘肽（GSH）上海酵母厂产品；碘代乙酸，上海生化所东风厂产品。其他化学试剂均为国产分析纯试剂。

酶活性测定：参照前文[5]方法进行，反应液中Ca^{++}的最后浓度为$1\times10^{-3}M$，但在三氯乙酸停止反应后，直接测定滤液在280nm处的光吸收。

结 果

一、最适pH值

pH对蝮蛇毒血纤蛋白溶酶水解酪蛋白的影响曲线如图1所示。

由图1可以看出，酶作用的最适pH值大约为8.5。

二、最适温度

温度对蝮蛇毒血纤蛋白溶酶水解酪蛋白的影响曲线如图2所示。

由图2可以看出，酶作用的最适温度在40°C左右。

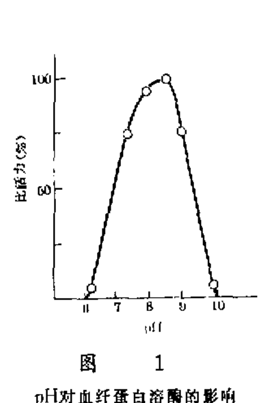


图 1

pH对血纤蛋白溶酶的影响

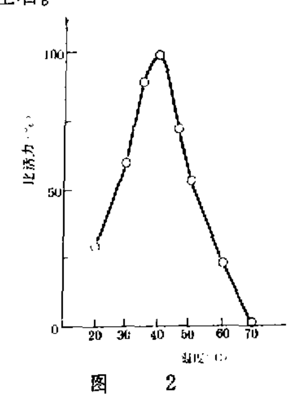


图 2

温度对血纤蛋白溶酶的影响

三、两价金属离子对酶活力的影响

两价金属离子在$2\times10^{-3}M$浓度对酶活力的影响如表1所示。

表1 两价金属离子对酶活力的影响

金属离子	对照	Ca^{++}	Mg^{++}	Hg^{++}	Co^{++}	Cu^{++}
酶活力	100	147	110	5	28	25

由表1可以看出Ca^{++}和Mg^{++}对酶活力有明显的激活作用，但Hg^{++}、Co^{++}和Cu^{++}却强烈地抑制酶活力。

四、EDTA对酶活力的影响

金属螯合剂EDTA对酶活力的影响如表2所示。

表 2　不同浓度的EDTA对纤溶酶活力的影响

最后浓度(M)	0	1×10^{-5}	5×10^{-5}	1×10^{-4}	5×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-3} + $1\times10^{-2}Ca^{++}$
相对活力	100	96	91	50	0	0	164

由表 2 可以看出，5×10^{-4}M EDTA 就能完全抑制酶活力，但这种抑制可以为 Ca^{++} 所解除。

五、Ca^{++} 和 EDTA 对酶热失活速率的影响

蝮蛇毒血纤蛋白溶酶对热很不稳定，在37°C保温就丧失活力，从图 3 可以看出，失活反应呈现很好的一级反应。

由图 3 还可以看出，Ca^{++}能显著地增加酶对热的稳定性，EDTA却降低酶对热的稳定性。

六、巯基化合物和巯基试剂对酶热失活速率的影响

试验了四种巯基化合物—半胱氨酸，巯基乙醇、巯基乙酸和谷胱甘肽对酶热失活速率的影响，其中以半胱氨酸增强酶热失活速率最为明显，巯基乙醇次之，巯基乙酸再次之，谷胱甘肽不改变酶的热失活速率（图 4）。

两种巯基试剂—对氯汞苯甲酸和碘代乙酸都不影响酶对热的稳定性（图 4）。

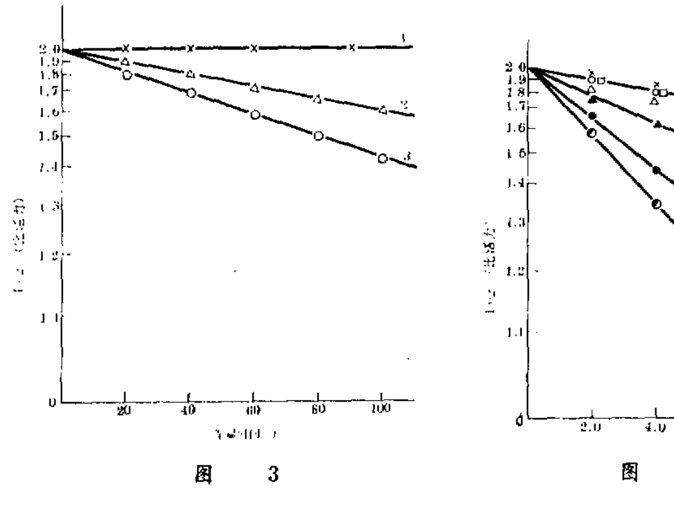


图 3

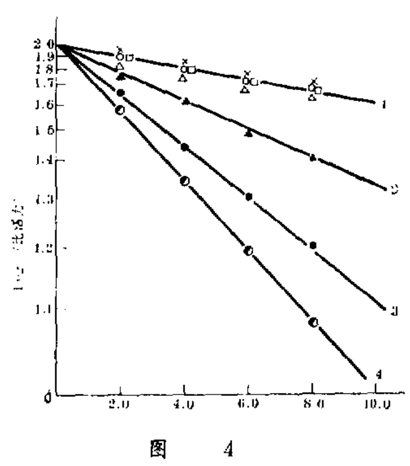


图 4

讨　论

蛇毒非专一性蛋白水解酶与来源于低等生物的蛋白水解酶相似，是一类“金属蛋白酶”，或称之为“金属螯合剂灵敏蛋白酶”。它们都能为两价金属离子所激活，但为金属螯合剂所抑制。由表 1 和表 2 可以看出，浙江产蝮蛇毒血纤蛋白溶酶亦是一种“金属

蛋白酶"，Ca^{++}和Mg^{++}明显地激活它水解酪蛋白的活力，但Hg^{++}、Co^{++}和Cu^{++}却强烈地抑制酶活力。EDTA在5×10^{-4}M浓度就能完全抑制酶活力。

图3的结果表明，Ca^{++}还能显著地增强血纤蛋白溶酶的对热稳定性。这很可能是由于Ca^{++}能够稳定酶的特殊构型，因而它对酶呈现活力是必需的。

四种巯基化合物都能增强蝮蛇毒血纤蛋白溶酶的热失活速率，考虑到它们可能与酶分子发生-S-S-链交换反应，提示酶分子中的-S-S-键对于维系蛋白构型亦是十分重要的。

参 考 文 献

1. Oshima, G. et al., Studies on snake venoms XIX. Purification and some physicochemical properties of proteinase a and c from the venoms of Agkistrodon halys blomhoffi. J. Biochem. 1968, 64, 227.
2. Oshima, G. et. al., Some properties of proteinase b in the venom of Agkistrodon halys blomhoffi. Biochim. Biophys. Acta. 200, p. 416.
3. 叶智彰等，浙江产蝮蛇蛇毒纤溶组份对凝血系统的作用. 动物学研究，1981，2，1，33.
4. 阮长耿等，蝮蛇蛇毒纤溶酶对纤维蛋白原的作用. 动物学研究，1981，2，2，163.
5. 阮长耿等，浙江产蝮蛇毒对凝血系统的作用. 生物化学与生物物理学报，1979，1，19.

STUDIES ON THE ENZYMATIC PROPERTIES OF THE FIBRINOLYTIC ENZYME OF *AGKISTRODON HALYS* PALLAS VENOM (FROM ZHEJIANG PROVINCE)

Tu Guang-chou Yu Li Xiu Jing-jiu Ran Yong-lu
(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

ABSTRACT

The fibrinolytic enzyme was found to be a kind of "metalloproteinase", Ca^{++} and Mg^{++} ions activated, whereas Hg^{++}, Co^{++}, and Cu^{++} ions inhibited it. EDTA, 5×10^{-4}M, fully inhibited the proteolytic activity of the enzyme. The inhibition could be reversed by adding Ca^{++} or Mg^{++} ions.

With casein as the substrate, the optimal pH of the fibrinolytic enzyme was about 8.5 and the optimal temperature about 40°C.

The enzyme was highly heatlabile and lost its activity at 37°C. The inactivation was shown to be a clearcut firstorder reaction. Ca^{++} ion increased but EDTA reduced the heatstability of the enzyme. CySH, thioacetic acid and mercaptoethanol reduced the heatstability of the enzyme, but GSH, PCMB and iodoacetic acid did not cause any change in its heatstability.